บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

วัสดุเกษตร

ตัวอย่างมะเขือที่มีวางจำหน่ายในตลาดสดรอบๆเขต อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ในช่วงเดือนมีนาคม 2548 – กรกฎาคม 2550 และผลมะเขือที่ปลูกมะเขือจำนวน 4 พันธุ์ จากแปลงเกษตรทดลองของศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนมกราคม - กรกฎาคม 2250 ติดป้ายที่ดอกมะเขือแต่ละพันธุ์หลังดอกได้รับการผสมติดแล้วทุกๆ 2 วันจนครบ 1 เดือน เก็บผลมะเขือทั้งหมดและแบ่งออกเป็น 5 ระยะการเจริญโดยนับอายุผลจากวันที่ติดป้ายจนผลแก่จัด

ระเบียบวิธีวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอล กิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น และกิจกรรมของเอนไซม์ PPO

1. **ลักษณะทั่วไปของมะเขือ**

1.1 ลักษณะของมะเขือที่เก็บตัวอย่างได้

นำผลมะเขือที่เก็บตัวอย่างได้จากตลาดมาแบ่งกลุ่มตามลักษณะของสีผิวเปลือก ลักษณะทรงผล ขนาดผล สีและลักษณะของก้านผล สีของเมล็ด ชั่งน้ำหนัก บันทึกภาพและทำคำบรรยายลักษณะของผลมะเขือแต่ละชนิด

1.2 ค่าดัชนีสีน้ำตาล (Browning index)

นำผลมะเขือแต่ละชนิด ที่มีระยะอ่อนแก่แตกต่างกันมาหั่นตามขวางแล้ววัดค่าสีโดยใช้เครื่องวัดสี (Colour Quest XE, Hunter Lab) โดยวัดค่าสี CIE L* ค่า L* เป็นค่าที่บอกถึงความสว่างของชิ้นมะเขือ มีค่าตั้งแต่ 0 – สีดำ ถึง 100 – สีขาว ค่า a* และค่า b* เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปกำหนดค่าสีในโปรแกรม Adobe Photoshop การวัดจะเริ่มเมื่อหั่น และทุกๆ 10 นาทีจนครบเวลา 1 ชั่วโมง หรือหยุดวัดสีเมื่อสีของชิ้นมะเขือไม่มีการเปลี่ยนแปลง นำค่าที่ได้ไปกำหนดดัชนีการเกิดสีน้ำตาลของผลมะเขือ แล้วนำ scale ที่ได้มาเทียบกับการเกิดสีน้ำตาลของเนื้อมะเขือพันธุ์อื่นๆ เพื่อเปรียบเทียบการเกิดสีน้ำตาล

2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

2.1 การสกัดสารประกอบฟีนอล

นำผลมะเขือแต่ละชนิด มาสกัดสารประกอบฟีนอลจากมะเขือทั้งผล นำมะเขือมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แช่เยือกแข็งทันทีด้วยไนโตรเจนเหลว นำตัวอย่างไปบดละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารละลายเมทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัดลงไปปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันบนเครื่องวอร์เทกซ์ นาน 30 วินาที นำตัวอย่างตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนานประมาณ 30 นาที นำตัวอย่างออกมาเขย่าบนเครื่องวอร์เทกซ์ทุกๆ 10 นาที นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบ 4000g ต่อนาที นาน 20 นาที นำของเหลวที่อยู่ด้านบนกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 มิลลิเมตร 2 ครั้ง สกัดสารประกอบฟีนอลจากตัวอย่างมะเขือแต่ละชนิดจำนวน 5 ซ้ำ นำสารประกอบฟีนอลทั้งหมดที่สกัดได้ไปเก็บไว้ในที่มืดและเย็นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดต่อไป

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ มาเจือจางให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลอยู่ในช่วงเดียวกับสารละลายมาตรฐาน โดยใช้น้ำกำจัดไอออน ใช้ตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 85 ไมโครลิตร ตัวอย่างละ 5 ซ้ำใส่ลงไปในแต่ละหลุมบนถาด microplate เติมสารละลาย $NaCO_3$ ความเข้มข้น 0.75% เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เติมสารละลาย Folin-Ciocalteau หุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอล์ยเพื่อป้องกันแสง นำไปวางบนเครื่องเขย่าสารนาน 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 725 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate spectrophotometer (Spectra MR, Dynex Technologies) นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเทียบเท่ากับปริมาณกรดแกลลิกของสารละลายมาตรฐาน (gallic acid equivalent – GAE) ต่อน้ำหนักสดของมะเขือ 1 กรัม

3. กิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอลจากมะเขือสายพันธุ์ต่างๆ

เนื่องจากมีวิธีการวิเคราะห์หากิจกรรมการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นหลายแบบ แต่ละวิธีมีความเหมาะสมกับชนิดของสารที่นำมาทดสอบแตกต่างกัน จึงได้เลือกวิธีการทดสอบมา 3 วิธีที่นิยมใช้คือ วิธีการฟอกจางสีของเบต้าแคโรทีน (β-carotenoid bleaching) วิธียับยั้งการฟอกจางสีของ (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl - DPPH) และ วิธีการวัด 2,2'-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid - $ABTS^{\bullet+}$ assay

3.1 วิธีการวิเคระห์โดยใช้เทคนิคยับยั้งการฟอกจางสารละลายเบต้า-แคโรทีน

นำสารสกัดสารประกอบฟีนอลจากมะเขือมาวิเคราะห์หากิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น โดยใช้วิธีดัดแปลงจาก Dapkevicius *et al.* (1998) เตรียมจากสารละลายเบต้า-แคโรทีน

ในคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร กรดลิโนเลอิก 20 มิลลิกรัม และ Tween 200 มิลลิกรัม กำจัดคลอโรฟอร์มออกโดยนำไปประเหยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการเติมอากาศนาน 1 ชั่วโมงลงในสารละลาย เขย่าอย่างแรง นำสารประกอบฟีนอลไปผสมกับสารละลายเบต้า-แคโรทีนที่เตรียมไว้ลงใน microplate ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ โดยใช้อัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลต่อสารละลายเบต้า-แคโรทีน เท่ากับ 0.2:5 เขย่าให้เข้ากัน หุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอล์ยเพื่อป้องกันแสง นำไปเขย่าในที่มืดและอุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร คำนวณหาความสามารถในการยับยั้งการฟอกจางสารละลายเบต้า-แคโรทีน โดยใช้สารละลาย butylated hydroxyl-toluene – BHT (Sigma-Aldrich, USA) ความเข้มข้น 0-40 mgต่อมิลลิตร เป็นสารละลายมาตรฐาน นำค่าที่วัดได้มาคำนวณจากกราฟมาตรฐาน เพื่อหากิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอลต่อน้ำหนักสดของมะเขือ 1 กรัม

3.2 วิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคยับยั้งการฟอกจางสีของสาร DDPH

นำสารประกอบฟีนอลจากมะเขือมาวิเคราะห์หากิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น โดยดัดแปลงจากวิธีของ Mahattanatawee *et al.*(2006) เตรียมสารละลาย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) โดยชั่งสารจำนวน 74 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร กรองด้วย syringe filter ขนาด 0.45 มิลลิเมตร เพื่อกำจัดตะกอน นำสารประกอบฟีนอลของมะเขือชนิดต่างๆ มาเจือจางในปริมาณที่เหมาะสมด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ นำตัวอย่างใส่ลงใน microplate หลุมละ 15 ไมโครลิตรและเติมเมทานอล ความเข้มข้น 95% ปริมาตร 15 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 150 ไมโครลิตรทำตัวอย่างละ 5 ซ้ำ หุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอล์ยเพื่อป้องกันแสง เขย่าบนเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 2 ชั่วโมงในที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณหากิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ที่ใช้สารละลายกรดแกลลิก ปริมาณ 0-50 ไมโครลิตรเป็นสารละลายมาตรฐาน นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหากิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอลต่อน้ำหนักสดของมะเขือ 1 กรัม

3.3 วิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค ABTS$^{\bullet+}$
(2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) assay

นำสารสกัดสารประกอบฟีนอลจากมะเขือมาวิเคราะห์หากิจกรรมในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น โดยดัดแปลงจากวิธีของ Nenadis *et al.* (2004) เตรียมสารละลาย ABTS$^{\bullet+}$ โดยนำ สารละลาย ABTS$^{\bullet+}$ ความเข้มข้น 7mM มาเติมด้วยสารละลาย potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 140 mM จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ $K_2S_2O_8$ เท่ากับ 2.45 mM นำสารละลายที่ได้ไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อจะนำไปใช้ นำสารละลาย ABTS$^{\bullet+}$ ที่เตรียมไว้มาเจือจางด้วยเอทานอลจนมีค่าดูดกลืนแสงอยู่ระหว่าง 0.7±0.05 เมื่อนำไป

วัดที่ช่วงคลื่น 734 นาโนเมตร นำสารประกอบฟีนอลที่สกัดจากตัวอย่างมะเขือมาเจือจางด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ 20 เท่า เติมสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้วลงใน microplate หลุมละ 30 ไมโครลิตรตัวอย่างละ 5 ซ้ำ เติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ลงไปแล้วเขย่าให้เข้ากันบนเครื่องเขย่าสารในที่มืดและอุณหภูมิห้องนาน 25 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 734 นาโนเมตรคำนวณหากิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นโดยคำนวณจากกราฟมาตรฐาน ที่ใช้สารละลาย Trolox ความเข้มข้น 0-0.15 µM เป็นสารละลายมาตรฐาน ต่อน้ำหนักสดของมะเขือ 1 กรัม (Trolox equivalent antioxidant capacity - TEAC).

4. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลและกิจกรรมต้านการเกิดออกซิเดชั่น

เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลที่สกัดได้จากผลมะเขือชนิดต่างๆ และ กิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอล ที่วัดได้จากวิธีต่างๆ ข้างต้น ดังนั้นสารละลายมาตรฐานที่จะใช้ควรจะเป็นสารชนิดเดียวกัน ดังนั้นกราฟมาตรฐานของทั้ง 3 วิธี จึงสร้างขึ้นจากการใช้สารละลายกรดแกลลิก ความเข้มข้นต่างๆ ที่เหมาะสม คือ 0- 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากแต่ละวิธีมาคำนวณหากิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารสกัดฟีนอลจากมะเขือแต่ละชนิด แล้วนำมาสร้างกราฟ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลที่วัดได้ และ กิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของตัวอย่างสารประกอบฟีนอลจากมะเขือแต่ละชนิด เพื่อเลือกวิธีการวัด กิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่มีความสัมพันธ์กับสารประกอบฟีนอลมากที่สุด และใช้วัดตัวอย่างอื่นๆ ต่อไป

5. ชนิดของสารประกอบฟีนอลที่สกัดได้จากมะเขือบางชนิด

นำสารประกอบฟีนอลที่สกัดได้จากมะเขือที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูงที่สุด 5 ชนิดมาวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟีนอลโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ ใช้สารละลาย n-butanol : glacial acetic : distilled water (5:2:3) โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา นำกระดาษโครมาโทกราฟีขนาด 20 x 20 เซนติเมตร มาจุดสารสกัดหยาบลงบนกระดาษโดยใช้หลอดคาปิลารี จำนวน 6 จุด จุดละ 30 ไมโครลิตรนำไปใส่ในแทงค์ที่มีสารละลายตัวพา 100 มิลลิลิตร เมื่อสารละลายเคลื่อนที่ถึงด้านบน จึงนำกระดาษออกมาเป่าให้แห้งแล้วนำโครมาโทแกรมที่ได้ไปตรวจสอบดูการเรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และทดสอบผลการเกิดสีบนโครมาโทแกรมโดยพ่นด้วยสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บันทึกค่า R_f และสีของสารแต่ละชนิดที่แยก ตัดกระดาษบริเวณที่มีแถบของสารประกอบฟีนอลที่แยกได้บนแถบโครมาโทแกรมไปละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำสารที่แยกได้ไปทดสอบกิจกรรมในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารแต่ละชนิดอีกครั้ง

6. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ PPO

6.1 การสกัดเอนไซม์

สกัดเอนไซม์โดยใช้วิธีดัดแปลงจาก Concellon *et al.* (2004) โดยนำมะเขือหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และแช่เยือกแข็งทันทีด้วยไนโตรเจนเหลว นำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้ว 2 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารละลายสกัด (extraction buffer) ในอัตราส่วนปริมาตรสารละลายสกัดต่อน้ำหนักมะเขือเท่ากับ 5:1 ซึ่งสารละลายสกัดนี้ประกอบด้วย สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1M พีเอช 6.5 และ Polyvinyl-pyrrolidone (PVPP) ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้สารสกัดและตัวอย่างมะเขือผสมกันให้เข้ากันบนเครื่องผสมสารประมาณ 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที นำตัวอย่างมาปั่นบนเครื่องผสมสารทุกๆ10 นาที ตกตะกอนตัวอย่างมะเขือด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็วรอบ 5000gต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายหลังการปั่นเหวี่ยงนำเฉพาะของเหลวใส (supernatant) ซึ่งเป็นเอนไซม์สกัดหยาบไปใช้วัดกิจกรรมของเอนไซม์ PPO และวัดปริมาณโปรตีนตามวิธี Bradford (1976) โดยใช้โปรตีน Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

6.2 การวัดกิจกรมของเอนไซม์ PPO

นำเอนไซม์สกัดหยาบของตัวอย่างมะเขือแต่ละชนิดไปวัดกิจกรรมที่เกิดขึ้นการเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ (assay mixture) โดยนำเอนไซม์ปริมาตร 30 ไมโครลิตรใส่ลงไปในแต่ละหลุมบน microplate เติมสารละลาย 4-methyl catechol (Sigma-Aldrich, Singapore) ความเข้มข้น 10 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1M พีเอช 6.5 ที่เตรียมใหม่ ลงไปบน microplate หลุมละ 150 ไมโครลิตรทำตัวอย่างละ 5 ซ้ำ เมื่อใส่สับสเทรตแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร แบบ kinetic assay เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 10 วินาทีจนครบ 3 นาที นำค่าที่วัดได้ในแต่ละช่วงนาทีมาคำนวณอัตราการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ในระยะเวลา 1 นาที

กำหนดให้หนึ่งหน่วยเอนไซม์ (unit) หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ โดยการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร 0.001 หน่วยต่อนาที แล้วคำนวณเป็น กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity)

7. ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด กิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอล และกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ระหว่างการเจริญของผลมะเขือ

7.1 ระยะการเจริญของมะเขือ

นำผลมะเขือที่เก็บจากแปลงปลูกทั้ง 4 ชนิดๆ มาแบ่งกลุ่มออกเป็น 5 ระยะตามอายุของผลมะเขือหลังจากวันดอกบานทุกๆ 6 วัน นำผลมะเขือมาชั่งน้ำหนัก วัดขนาดของผล และบันทึกภาพของผลในระยะการเจริญต่างๆ

7.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

นำผลมะเขือมาสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดตามวิธีการที่ระบุไว้ในการทดลองตอนที่ 1 เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลระหว่างมะเขือแต่ละสายพันธุ์ และเปรียบเทียบระหว่างการเจริญเติบโตของแต่ละสายพันธุ์

7.3 กิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอล

นำสารประกอบฟีนอลทั้งหมดที่สกัดได้จากผลมะเขือแต่ระยะการเจริญของมะเขือแต่ละสายพันธุ์มาวัดกิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นด้วย DPPH assay ดังที่ระบไว้ในการทดลองที่ 2.1 เปรียบเทียบกิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอลทั้งหมดที่สกัดได้ของมะเขือแต่ละพันธุ์ระหว่างการเจริญเติบโต และเปรียบเทียบกิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นระหว่างมะเขือแต่ละสายพันธุ์

ตอนที่ 2 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ PPO ที่สกัดจากมะเขือบางชนิด

นำเอนไซม์ PPO ของมะเขือ 5 ชนิดที่มีกิจกรรมสูงที่สุดในแต่ละกลุ่มของมะเขือ (แยกตามสีเปลือก) มาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ PPO ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ ชนิดของสับสเทรตเฉพาะและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสับสเทรตนั้น ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอล ความเสถียรของเอนไซม์เมื่อได้รับความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ รวมถึงสารที่เหมาะสมสำหรับยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ของมะเขือแต่ละชนิด ซึ่งมีวิธีการศึกษาดังนี้

1. ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม (optimal enzyme concentration)

นำเอนไซม์ของมะเขือแต่ละชนิดมาเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1M พีเอช 6.5 ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-20% นำเอนไซม์ที่เจือจางแล้วปริมาตร 30 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในแต่ละหลุมบน microplate เติมสารละลาย 4-methyl catechol (4-MC) ความเข้มข้น 10 mM มาใส่ลงไปในหลุมๆ ละ 150 ไมโครลิตรทำตัวอย่างละ 5 ซ้ำ เมื่อใส่สับสเทรตแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร วัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 10 วินาทีจนครบ 3 นาที นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหา specific activity ของเอนไซม์ สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นและกิจกรรมของเอนไซม์ เพื่อหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

2. สับสเทรตเฉพาะและความเข้มข้นที่เหมาะสม (specific substrate and optimal concentration)

เตรียมสารละลายสับสเทรตทั้งหมด 6 ชนิดคือ 4-methylcatechol (4-MC), catechol, pyrocatechol (PC), catechin, tert-4-butylcatechol (4-TC) และ dopamine ความเข้มข้น 5-20 mM ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1M พีเอช 6.5 นำเอนไซม์มาเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1% นำเอนไซม์ PPO ที่เจือจางแล้วปริมาตร 40 ไมโครลิตรใส่ลงไปใน microplate เติมสารละลายสับสเทรตแต่ละชนิดและความเข้มข้นที่เตรียมไว้ใส่ลงไปแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร ทุกๆ 10 วินาทีจนครบ 3 นาที นำค่าที่ได้ไปคำนวณหากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ PPO

3. อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ (optimal temperature)

นำเอนไซม์ PPO ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 40 ไมโครลิตรใส่ลงไปใน microplate นำสารละลาย 4-MC ความเข้มข้น 10mM ที่มีอุณหภูมิในช่วง 2-80 ^{o}C โดยแช่สารละลายสับสเทรตในน้ำแข็งหรืออุ่นในอ่างน้ำร้อน และวัดอุณหภูมิของสารละลายสับสเทรตด้วยเครื่องวัดอุณหภูมิระบบดิจิตอลแบบเข็ม (Thermocouple needle thermometer, Testo 925) ใส่ลงไปใน microplate ที่เตรียมไว้ ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

400 นาโนเมตร ทุกๆ 10 วินาทีจนครบ 3 นาที นำค่าที่ได้ไปคำนวณหากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ PPO

4. ความเสถียรเมื่อได้รับความร้อน (thermal stability)

นำเอนไซม์ PPO ของมะเขือแต่ละชนิดใส่ใน microcentrifuge tube หลอดละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 5 ซ้ำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ60^{o}C เป็นระยะเวลานาน 0, 15, 30, 45 และ 60 นาที เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาแต่ละช่วง นำหลอดบรรจุเอนไซม์แช่น้ำแข็งเพื่อลดอุณหภูมิทันที นำเอนไซม์ที่ผ่านความร้อนแล้วไปเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นเหลือ 1% แล้วนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ PPO โดยใช้ เอนไซม์ที่เจือจางแล้วปริมาตร 40 ไมโครลิตรเติมสารละลาย 4-MC ความเข้มข้น 10mM ลงไปแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร ทุกๆ 10 วินาทีจนครบ 3 นาที นำค่าที่ได้ไปคำนวณหากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ PPO

5. สารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ และความเข้มข้นที่เหมาะสม (enzyme inhibitors)

เตรียมสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ทั้งหมด 5 ชนิดคือ EDTA, sodium metabisulphite (SMF), sodium chloride (NaCl), กรดซิตริก และกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 100mM นำเอนไซม์ PPO ของมะเขือแต่ละชนิดความเข้มข้น 1% ปริมาตร 40 ไมโครลิตรใส่ลงไปใน microplate เติมสารละลาย 4-MC ความเข้มข้น 10mM จากนั้นเติมสารสารยับยั้งแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ลงไปผสมกบเอนไซม์ PPO โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5, 1.0, 2.0 และ 2.5mM ทำตัวอย่างละ 5 ซ้ำ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร ทุกๆ 10 วินาทีจนครบ 3 นาที นำค่าที่ได้ไปคำนวณหากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ PPO

6. การศึกษาการกระจายตัวของโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์ PPOที่สกัดจากมะเขือบางชนิด

5.1 การศึกษาการกระจายตัวของโปรตีนของเอนไซม์ PPO

นำเอนไซม์ที่สกัดได้จากมะเขือที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ PPOสูงสุด 5 ชนิดมาศึกษาการกระจายตัวของโปรตีนโดยใช้เทคนิคที่ดัดแปลงจาก Mazzafera and Robinson (2000) และ de Fatima Pereira Goulart *et al.*, (2003) นำเอนไซม์ที่สกัดได้มาเติม mercaptoethanol แล้วทำให้เสื่อมสภาพโดยใช้ความร้อนก่อนนำไปแยกโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ที่มีเจล polyacrylamide ความเข้มข้น 7% ผ่านกระบวนการอิเลคโตรโฟรีซีสเพื่อแยกโปรตีนออกจากกัน แล้วย้อมสีเจลด้วยสี Coomassie blue

5.2 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ PPO บน SDS gel

นำเอนไซม์สกัดหยาบที่ได้จากมะเขือ มาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยใช้วิธีของ Cheng *et al.* (2007) นำเอนไซม์ที่ไม่ได้ถูกทำให้เสื่อมสภาพ มาแยกโปรตีนออกเป็นขนาดต่างๆ ด้วยเทคนิค SDS-gel electrolphoresis ที่มีเจล SDS polyacrylamide ความเข้มข้น 7% แยกด้วยกระแสไฟ 20mA ที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C เมื่อสิ้นสุดการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า นำแผ่นเจลที่ได้ไปวางทาบลงบนกระดาษอิ่มตัวสับสเทรต เตรียมโดยนำกระดาษกรอง Whatman เบอร์1 มาตัดให้มีขนาดเท่ากับแผ่นเจล 8.5X8.5 cm ชุบด้วยสารละลาย cathecol ความเข้มข้น 10mM นำไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 30 ^{o}C หากเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ PPOจะมีแถบสีน้ำตาลปรากฏขึ้นบนแผ่นกระดาษและบนแผ่นเจล เนื่องมาจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ PPO กับสารตั้งต้นและได้สารสีน้ำตาลออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ บันทึกภาพของแถบสีน้ำตาลที่ปรากฏ หลังจากทดสอบทุกๆ นาทีจนครบ 15 นาที